

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

|  |           |  |
|--|-----------|--|
| (51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :<br>A23J 1/20, A23C 9/146, C07K 14/47,<br>A61K 7/16   | <b>A1</b> | (11) Numéro de publication internationale: <b>WO 98/53702</b><br>(43) Date de publication internationale: 3 décembre 1998 (03.12.98)   |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/EP98/03176<br>(22) Date de dépôt international: 22 mai 1998 (22.05.98)<br>(30) Données relatives à la priorité:<br>97201607.5          27 mai 1997 (27.05.97)          EP<br>(34) Pays pour lesquels la demande régionale<br>ou internationale a été déposée:          CH etc.<br>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SOCIÉTÉ<br>DES PRODUITS NESTLÉ S.A. [CH/CH]; Case postale 353,<br>CH-1800 Vevey (CH).<br>(72) Inventeurs; et<br>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ERDMANN, Peter<br>[CH/CH]; Klaraweg 7, CH-3006 Bern (CH); NEUMANN,<br>Fred [DE/CH]; Chaletweg 2, CH-3612 Steffisburg (CH).<br>(74) Mandataire: ARCHAMBAULT, Jean; 55, avenue Nestlé,<br>CH-1800 Vevey (CH).  |           | (81) Etats désignés: AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, JP,<br>KR, MX, NO, NZ, PL, SG, TR, US, brevet eurasiatique (AM,<br>AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT,<br>BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,<br>MC, NL, PT, SE).<br>Publiée<br><i>Avec rapport de recherche internationale.<br/>         Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des<br/>         revendications, sera republiée si des modifications sont<br/>         reçues.</i> |
| (54) Title: METHOD FOR TREATING A LACTIC RAW MATERIAL CONTAINING GMP<br>(54) Titre: PROCÉDE DE TRAITEMENT D'UNE MATIÈRE PREMIÈRE LACTIQUE CONTENANT DU GMP<br>(57) Abstract<br><p>The invention concerns a simple ion-exchanging industrial process which consists in treating a liquid lactic raw material containing glycomacropeptide in the presence of a weak anionic resin to obtain an improved protein product useful in food processing and said glycomacropeptide which is selectively adsorbed on the resin, then eluted in said resin. Before being treated with resin, the liquid raw material is decationized so that its pH has a value between 1 and 4.5.</p> (57) Abrégé<br><p>Un procédé industriel simple d'échange d'ions consiste à traiter une matière première lactique liquide contenant le glycomacropeptide en présence d'une résine anionique faible de manière à obtenir un produit protéique amélioré utilisable en alimentation et ledit glycomacropeptide qui est adsorbé sélectivement sur la résine, puis élué de ladite résine. Avant le traitement avec la résine, la matière première liquide est décationisée de sorte que le pH ait une valeur de 1 à 4,5.</p> |           |  |

# UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |   |    |  |    |                       |
|----|---------------------------|----|---|----|--|----|-----------------------|
| AL | Albanie                   | ES | Espagne                                       | LS | Lesotho                                  | SI | Slovenie              |
| AM | Arménie                   | FI | Finlande                                      | LT | Lituanie                                 | SK | Slovaquie             |
| AT | Autriche                  | FR | France  | LU | Luxembourg                               | SN | Sénégal               |
| AU | Australie                 | GA | Gabon   | LV | Lettonie                                 | SZ | Swaziland             |
| AZ | Azerbaïdjan               | GB | Royaume-Uni                                   | MC | Monaco                                   | TD | Tchad                 |
| BA | Bosnie Herzégovine        | GE | Géorgie                                       | MD | République de Moldova                    | TG | Togo                  |
| BB | Barbade                   | GH | Ghana   | MG | Madagascar                               | TJ | Tadjikistan           |
| BE | Belgique                  | GN | Guinée  | MK | Ex-République yougoslave<br>de Macédoine | TM | Turkménistan          |
| BF | Burkina Faso              | GR | Grèce   | ML | Mali                                     | TR | Turquie               |
| BG | Bulgarie                  | HU | Hongrie                                       | MN | Mongolie                                 | TT | Trinité-et-Tobago     |
| BJ | Bénin                     | IE | Irlande                                       | MR | Mauritanie                               | UA | Ukraine               |
| BR | Bразил                    | IL | Israël  | MW | Malawi                                   | UG | Ouganda               |
| BY | Biélorus                  | IS | Islande                                       | MX | Mexique                                  | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada                    | IT | Italie  | NE | Niger                                    | UZ | Ouzbékistan           |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon   | NL | Pays-Bas                                 | VN | Viet Nam              |
| CG | Congo                     | KE | Kenya   | NO | Norvège                                  | YU | Yougoslavie           |
| CH | Suisse                    | KG | Kirghizistan                                  | NZ | Nouvelle-Zélande                         | ZW | Zimbabwe              |
| CI | Côte d'Ivoire             | KP | République populaire<br>démocratique de Corée | PL | Pologne                                  |    |                       |
| CM | Cameroun                  | KR | République de Corée                           | PT | Portugal                                 |    |                       |
| CN | Chine                     | KZ | Kazakhstan                                    | RO | Roumanie                                 |    |                       |
| CU | Cuba                      | LC | Sainte-Lucie                                  | RU | Fédération de Russie                     |    |                       |
| CZ | République tchèque        | LI | Liechtenstein                                 | SD | Soudan                                   |    |                       |
| DE | Allemagne                 | LK | Sri Lanka                                     | SE | Suède                                    |    |                       |
| DK | Danemark                  | LR | Libéria                                       | SG | Singapour                                |    |                       |
| EE | Estonie                   |    |   |    |  |    |                       |

## PROCÉDE DE TRAITEMENT D'UNE MATIÈRE PREMIÈRE LACTIQUE CONTENANT DU GMP

L'invention a trait à un procédé de traitement d'une matière première lactique contenant le glycomacropeptide ou caséinoglycomacropeptide (ci-après GMP), dans le but d'en séparer le dit GMP.

Le GMP est un macropeptide phosphorylé et partiellement sialylé qui est formé par l'action d'une protéase, par exemple la présure sur la kappa-caséine du lait des mammifères. Il représente environ 20 % en poids des protéines du lactosérum doux obtenu après séparation de la caséine lors de la fabrication de fromages.

On connaît un procédé de fabrication de GMP au niveau du laboratoire consistant à traiter une matière première d'origine lactique, telle que par exemple une caséine acide ou un caséinate, hydrolysés par la présure ou encore un lactosérum doux de fromagerie déminéralisé et délactosé, par l'acide trichloracétique de manière à précipiter les protéines, puis à recueillir le surnageant, à le dialyser et enfin à sécher le dialysat. Un tel procédé n'est pas industriel.

Un procédé de production de GMP à l'échelle industrielle, décrit dans EP-A- 0488589 consiste à traiter un produit lactosérique par échange d'ions, à recueillir la fraction n'ayant pas été adsorbée, à la concentrer et à la déminéraliser par ultrafiltration, diafiltration et le cas échéant osmose inverse et à recueillir le GMP.

Un procédé de production d'une fraction protéique de lactosérum est décrit dans UK-A-2188526. Celui-ci consiste à traiter un produit laitier par une résine anionique forte, dans des conditions telles que les protéines et certains peptides de la matière traitée sont adsorbés sur la résine de manière non-sélective sous forme de complexes. De tels complexes sont difficiles à éluer ensuite de la résine. L'éluat se caractérise par la formation d'un gel ferme à pH inférieur à 4,5 et à la température ambiante une fois mis en suspension dans l'eau. La fraction protéique peut être utilisée dans des boissons du genre des "milk-shake" et dans des mousses-desserts.

Dans JP-A-07132049, on propose d'utiliser une résine d'échange d'ions anionique faible dont la matrice est hydrophile pour séparer les peptides sialylés du lactosérum. La méthode employée consiste à faire passer la matière première dont le pH a été préalablement réglé de manière précise, à une valeur de 4 à 6, sur un support macromoléculaire hydrophile consistant en un polysaccharide naturel ou un polyvinyle

synthétique, greffé avec des groupes échangeurs basiques. Les supports utilisés comme matrice ne sont pas aisément applicables industriellement.

5 Le but de l'invention est la séparation sélective du GMP des autres composants des matières lactiques en une simple opération à l'échelle industrielle avec un rendement élevé.

10 L'invention concerne donc un procédé de traitement par échange d'ions d'une matière première lactique liquide contenant du GMP, dans le but de recueillir d'une part un produit utilisable directement comme source de protéine et d'autre part le GMP sous forme purifiée, caractérisé par le fait qu'il comprend les étapes suivantes:

- 15 i) Décationisation de la matière première liquide, de sorte que le pH ait une valeur de 1 à 4,5.  
ii) Mise en contact du dit liquide avec une résine anionique faible de matrice hydrophobe, de manière prédominante sous forme alcaline jusqu'à un pH stabilisé,  
15 iii) Séparation de la résine et du produit liquide que l'on recueille et  
iv) Désorption du GMP de la résine.

20 Comme matière première lactique, on peut utiliser dans le procédé selon l'invention tout produit ou sous-produit contenant le GMP. On peut citer à titre indicatif:

- le lactosérum doux obtenu après séparation de la caséine coagulée par la présure,
- un lactosérum doux ou un tel lactosérum plus ou moins déminéralisé par exemple par électrodialyse, échange d'ions, osmose inverse, électrodéionisation ou une combinaison de ces procédés,
- 25 - un concentrat de lactosérum doux,
- un concentrat de lactosérum doux plus ou moins déminéralisé par exemple par électrodialyse, échange d'ions, osmose inverse, électrodéionisation ou une combinaison de ces procédés,
- un concentrat de protéines de lactosérum doux fortement délactosé obtenu par exemple par ultrafiltration, puis diafiltration (ultrafiltration avec lavage),
- 30 - les eaux-mères de cristallisation du lactose à partir d'un lactosérum doux,
- un perméat d'ultrafiltration d'un lactosérum doux,
- le produit de l'hydrolyse par une protéase d'une caséine native obtenue par précipitation acide du lait écrémé par un acide minéral ou par acidification biologique,
- 35 le cas échéant avec addition d'ions calcium ou encore d'une caséine micellaire, obtenue par exemple par microfiltration d'un lait écrémé,
- le produit de l'hydrolyse d'un caséinate par une protéase.

Une matière première préférée est un lactosérum doux de fromagerie préconcentré, de préférence à 10-23 % en poids et décationisé ou complètement déionisé, c'est à dire décationné et désanioné.

- 5 Une autre matière de choix de choix est un concentrat de protéines de lactosérum doux délactosé et décationné.

10 Ces matières premières peuvent se présenter sous forme liquide ou sous forme de poudre et dans ce dernier cas on les met en dispersion dans l'eau, de préférence déminéralisée en vue de leur traitement ultérieur.

Ces matières premières peuvent provenir de lait de ruminant tel que vache chèvre, brebis ou bufflesse.

- 15 Selon un premier mode de réalisation du procédé, on met la matière première liquide en présence de résine anionique faible dans un réacteur sous agitation modérée à une température  $< 50^{\circ}\text{C}$ , de préférence comprise entre 0 et  $15^{\circ}\text{C}$ . L'agitation doit être juste nécessaire à la fluidisation du lit de résine. Celle-ci peut être produite par exemple par un agitateur ou, de préférence par l'introduction d'un courant de fluide, par exemple d'air ou d'azote sous pression par le bas du réacteur.

25 On peut utiliser toute résine échangeuse d'anions dont la matrice est hydrophobe et dont les groupes d'échange sont faiblement basiques sous forme de gel, macroporeuse ou macroréticulée, de préférence polystyrénique ou polyacrylique, particulièrement à base de copolymère polystyrène divinylbenzène et de préférence macroréticulée pour des raisons de résistance aux chocs osmotiques. Les groupes actifs sont généralement des amines de primaire à tertiaire. Une telle résine doit être de façon prédominante sous forme alcaline (qualifiée ci-après de forme  $\text{OH}^{-}$ ) et donc ses sites actifs doivent avoir été régénérés de préférence en grande partie sous cette forme.

30 Pendant cette mise en contact, les sites actifs de la résine sont échangés contre des molécules de GMP, ce qui produit une augmentation progressive du pH du liquide traité, jusqu'à une valeur finale stabilisée, par exemple de 4,5 à 5,5 selon la matière première mise en oeuvre. La durée de l'opération et les quantités respectives de résine et de liquide traité sont choisies en fonction de la composition du produit de départ et de la quantité de GMP désirée. Cette opération dure de 1 à 10 h, par exemple environ 4 h. Les proportions respectives de résine et de liquide à traiter peuvent varier

grandement et sont, en volume de 1:1 à 1:30 et de préférence de 1:1 à 1:10, selon le degré souhaité de séparation du GMP.

5 Selon un autre mode de réalisation, on peut percoler le liquide dans une colonne remplie de la résine, en recueillir le liquide traité et récupérer le GMP adsorbé sur la résine par élution. On peut pour ce faire procéder en continu ou en semi-continu, par exemple en extrayant la résine saturée de la colonne à contre-courant et en la remplaçant par de la résine fraîchement régénérée.

10 On peut combiner les modes de réalisation précédents, en réacteur et en colonne, par exemple en utilisant un dispositif mixte dont la partie supérieure est un réacteur muni de moyens d'agitation ou de production d'un lit fluidisé contenant la résine, séparé par une grille ou un filtre d'une partie inférieure constituée d'une colonne où l'on peut réaliser en fin de traitement la récupération de la résine, par exemple par décantation,  
15 le soutirage du liquide traité.

Le liquide ainsi traité peut être concentré, par exemple par évaporation, puis séché, par exemple par pulvérisation dans une tour de séchage.

20 La poudre ainsi obtenue sert avantageusement de matière première protéique dans la préparation des produits infantiles et est remarquable du fait de son profil en acides aminés souhaités, son aminogramme montrant un appauvrissement en thréonine et un enrichissement en acides aminés aromatiques, tels que le tryptophane.

25 Pour en séparer le GMP, on traite d'abord la résine par lavage, par exemple avec de l'eau déminéralisée, puis le cas échéant avec une solution saline diluée ou une solution acide diluée et on la rince à l'eau déminéralisée. La désorption proprement dite du GMP a lieu avec une solution aqueuse d'acide, de base ou de sel, de préférence avec  
30 une solution aqueuse basique, par exemple de NaOH, de KOH ou de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , avantageusement de concentration  $< 8\%$  en poids, de préférence de 0.5 à 3 %, suivie d'un lavage à l'eau déminéralisée. De cette manière, la résine est régénérée par la même occasion. On joint ensuite l'éluat et les eaux de lavage, puis on les déminéralise, par exemple par ultrafiltration ou nanofiltration sur membrane de zone de coupure moyenne environ 3000 dalton et on sèche le rétentat, par exemple par lyophilisation.

35

Le GMP ainsi obtenu est sensiblement exempt de matière grasse et de lactose et pauvre en protéines de lactosérum.

Il contient de préférence, en poids:

- < 1 % de matière grasse,
- < 0,2 % de lactose et
- < 3 % de protéines vraies de lactosérum.

5 Le GMP peut être utilisé dans ses applications connues, par exemple pour ses propriétés biologiques dans des compositions pharmaceutiques orales, parentérales ou sous-cutanées comme agent anti-thrombotique, anti-diarrhéique ou anti-bactérien ou de préférence comme agent anti-plaque et anti-carie dans des compositions d'hygiène dentaire, ou encore dans des aliments, par exemple des produits de confiserie pour ses propriétés anti-plaque et anti-carie, pour ses propriétés fonctionnelles d'agent émulsifiant, gélifiant ou moussant ou pour ses propriétés diététiques, par exemple dans des compositions infantiles anti-phénylcétonurie du fait qu'il ne contient pas de phénylalanine.

10 15 Un avantage non négligeable du procédé selon l'invention est qu'il n'y a pas de diminution de la performance de la résine ni d'encrassement de celle-ci, même après jusqu'à 150 cycles de traitement.

20 Les exemples ci-après illustrent l'invention, ainsi que la figure 1 du dessin, montrant, de manière schématique et à titre non-limitatif, un dispositif préféré de mise en oeuvre. Dans les exemples, les parties et pourcentages sont pondéraux sauf indication contraire.

### Exemple 1

25 Pour le traitement, on utilise le réacteur 1 constitué dans sa partie supérieure d'une cuve principale 2 communiquant dans sa partie inférieure avec un compartiment 3 de diamètre plus faible que celui de la cuve 2. La cuve 2 est pourvue d'un conduit d'amenée de liquide de rinçage 4, d'une amenée de gaz sous pression 5, d'une soupape de sécurité 6 permettant de réguler la pression de gaz dans le réacteur 1. A un niveau voisin de sa base la cuve 2 est pourvue d'une crépine 7 et d'un conduit de soutirage de liquide 8.

30 Au niveau du compartiment 3, le réacteur est muni d'un pH-mètre 9, d'une amenée de gaz 10 et communique par une vanne à trois voies 11 avec un conduit 12 d'amenée de liquide à traiter et un conduit d'évacuation 13 pour le liquide traité. A la base le compartiment 3 est pourvu d'une grille ou d'une plaque perforée 14 dont le rôle est de recueillir les billes de résine 15. En dessous de la grille 14, un conduit 16 de soutirage

amène le liquide par l'intermédiaire de la pompe 17 vers la cuve tampon 18 munie d'un dispositif de contrôle de niveau 19 et delà vers le conduit 20 par l'intermédiaire de la pompe 21. Le conduit 20 est relié soit au conduit 12, soit au trop-plein d'évacuation 22.

5

On disperse un concentrat de protéines de lactosérum doux bovin, traité de manière classique par électrodialyse et décationé sur résine cationique forte, dans de l'eau déionisée de sorte que la solution ait une teneur en matière sèche de 6,5 %.

10

Le concentrat a la composition ci-après:

|                        | %                |
|------------------------|------------------|
| Protéines (GMP inclus) | 76               |
| Lactose                | 4,8              |
| Cendres                | 2,5              |
| Lipides                | 8                |
| Eau                    | complément à 100 |

15 Par le conduit 12, on transfère 127 kg de la dispersion, de pH initial 4,25, à la température de 12° C dans le réacteur 1 par la base duquel on introduit de l'air en barbotage au niveau du compartiment 3, par l'amenée 10 par l'intermédiaire d'une vanne de non retour 23, de manière à créer un lit fluidisé de billes de résine 15  
20 comprenant 23 kg de résine anionique faible de matrice hydrophobe à base de polystyrène (IMAC HP 661<sup>(R)</sup>, Rohm & Haas, régénérée sous forme OH<sup>-</sup>). Les billes de résine 15 sont agitées pendant 4 h au contact de la dispersion du fait de la turbulence créée par la fluidisation. On contrôle constamment le pH au moyen du pH-mètre 9. La stabilisation du pH à 5,08 indique la fin de la réaction. On coupe alors l'arrivée d'air en 10 et on introduit de l'air par le haut du réacteur en 5 au dessus du  
25 niveau 24 de liquide, ce qui a pour effet de pousser le liquide et de décanter les billes de résine dans la partie inférieure 3 du réacteur 2 où elles sont retenues par la grille 14. On soutire le liquide traité par gravité par le conduit 8 et par le conduit 16 par l'intermédiaire de la pompe 17 vers la cuve tampon 18 et on l'évacue par le conduit 20 au moyen de la pompe 21 et delà vers la sortie par les conduits 12 et 13.

30

Après concentration du liquide à 28 % de matières sèches par évaporation, on sèche le concentrat par pulvérisation dans une tour de séchage (ces opérations n'étant pas représentées).

- 5 Une analyse du concentrat par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) montre que la réaction a enlevé 91 % du GMP de départ. Par ailleurs, la poudre contient 95 % des protéines de lactosérum de départ.

- 10 Pour recueillir le GMP, on lave le réacteur et la résine avec de l'eau déionisée depuis le conduit 25 et la vanne 26, puis le conduit 4 à travers le réacteur jusqu'à la sortie par les conduits 12 et 13. Par le même circuit, on élue le GMP avec deux fois 40 l de solution aqueuse à 2 % de NaOH distribuée par le conduit 27 et la vanne 28 et on rince avec 30 l d'eau déionisée. Après avoir joint les volumes d'éluat et de rinçage, on concentre l'ensemble à un volume de 25 l par ultrafiltration ou nanofiltration avec une membrane  
15 de coupure nominale de 3.000 dalton, puis l'on sèche le rétentat par lyophilisation (ces opérations n'étant pas représentées) et l'on obtient 750 g de GMP, ce qui correspond à un rendement de 82 % par rapport au GMP de départ.

- 20 Périodiquement, la résine subit une régénération acide après la régénération alcaline une fois que l'on a traité l'équivalent de 10 volumes de lit de résine. Pour ce faire, après l'élution du GMP par la solution alcaline tel que décrit précédemment, on amène une solution aqueuse concentrée de HCl par le conduit 29 et la vanne 30, respectivement 25 pour l'eau. La résine est ensuite mise sous forme OH<sup>-</sup> par passage d'une solution aqueuse concentrée de NaOH depuis les conduits 27, respectivement 25  
25 pour l'eau, puis 4, et sort ensuite du réacteur 1 par le conduit 16, est repris par la pompe 17 vers la cuve tampon 18, puis par la pompe 21 et évacué par le conduit 20 et le trop-plein 22 vers le traitement des effluents. A la suite de cette opération, la résine est prête pour un autre cycle de traitement.

### 30 Exemple 2

- On utilise un lactosérum doux bovin, préalablement concentré à 17 % de matière sèche, puis déminéralisé par électrodialyse, décationé sur colonne de résine cationique forte, désanioné sur colonne de résine anionique faible et séché par pulvérisation en  
35 tour de séchage, de composition indiquée ci-après:

|                        | %                |
|------------------------|------------------|
| Protéines (GMP inclus) | 11,7             |
| Lactose                | 81,7             |
| Cendres                | 1                |
| Lipides                | 1                |
| Eau                    | complément à 100 |

On solubilise cette poudre de lactosérum déminéralisée dans de l'eau déionisée. Après  
décationation, la solution a un pH initial de 3,8. Dans l'installation précédente, on  
5 traite 392 kg de cette solution à la température de 8° C en l'agitant dans le réacteur en  
présence de 23 kg de résine anionique faible de matrice hydrophobe à base de  
polystyrène (IMAC HP 661<sup>(R)</sup>, Rohm & Haas, régénérée sous forme OH<sup>-</sup>) pendant 4 h.  
La stabilisation du pH à 4,89 indique la fin de la réaction. On soutire alors le liquide et  
on recueille la résine comme précédemment. Après concentration du liquide à 45 % de  
10 matières sèches par évaporation, on sèche le concentrat par pulvérisation dans une tour  
de séchage.

Une analyse du concentrat par HPLC montre que la réaction a enlevé 89 % du GMP de  
départ. Par ailleurs, la poudre contient 9,1 % de protéines de lactosérum, ce qui  
15 correspond à un rendement de 90 % des protéines de lactosérum.

Pour recueillir le GMP, on lave la résine successivement avec de l'eau déionisée, avec  
30 l d'une solution aqueuse à 0,5 % de HCl et avec 30 l d'eau déionisée, puis on élue  
le GMP avec deux fois 40 l de solution aqueuse à 2 % de Ca(OH)<sub>2</sub> et on rince avec 30 l  
20 d'eau désionisée. Après avoir joint les volumes d'éluat et de rinçage, on concentre  
l'ensemble à un volume de 25 l par ultrafiltration avec une membrane de coupure  
nominale de 3.000 dalton, puis l'on sèche le rétentat par lyophilisation et l'on obtient  
900 g de GMP, ce qui correspond à un rendement de 80 % par rapport au GMP de  
départ.

25

### Exemple 3

On part d'un lactosérum doux, préconcentré à 18 % de matière sèche, décationé par  
traitement sur une colonne de résine cationique forte, dont le pH initial est 1,09.

30

Dans l'installation précédente, on traite 70 kg de ce lactosérum à la température de 25°  
C en l'agitant dans le réacteur en présence de 14 kg de résine anionique faible de

matrice hydrophobe à base de polystyrène (IRA 96<sup>(R)</sup> , Rohm & Haas, régénérée sous forme OH<sup>-</sup>) pendant 4 h. L'agitation se fait par création d'un lit fluidisé de billes de résine avec barbotage d'azote. La stabilisation du pH à 4,79 indique la fin de la réaction. On sépare alors le liquide de la résine comme précédemment. Après  
5 concentration du liquide à 45 % de matières sèches par évaporation, on sèche le concentrat par pulvérisation dans une tour de séchage.

Une analyse de la poudre par HPLC montre que la réaction a enlevé 85 % du GMP de départ. Par ailleurs, la poudre contient 9,2 % des protéines de lactosérum, ce qui  
10 correspond à un rendement de 90 % des protéines de lactosérum.

L'analyse de l'aminogramme du concentrat montre un profil se caractérisant par une diminution de 28 % de la thréonine, par une augmentation de 18 % de l'arginine et par une augmentation de 20 % du tryptophane.

Pour recueillir le GMP, on lave la résine successivement avec de l'eau déionisée, avec 50 l d'une solution aqueuse à 0,05 % de NaCl et deux fois 50 l d'eau déionisée, puis on élue le GMP avec deux fois 25 l de solution aqueuse à 0,6 % de KOH et on rince avec 10 l d'eau déionisée. Après avoir joint les volumes d'éluat et de rinçage, on concentre  
20 l'ensemble à un volume de 25 l par ultrafiltration avec une membrane de coupure nominale de 3.000 dalton, puis l'on sèche le rétentat par lyophilisation et l'on obtient 175 g de GMP, ce qui correspond à un rendement de 80 % par rapport au GMP de départ.

#### 25 Exemple 4

On part d'une poudre de perméat d'ultrafiltration de lactosérum doux débarrassée de la plupart de ses sels dont la composition est la suivante:

|                        | %                |
|------------------------|------------------|
| Protéines (GMP inclus) | 2,75             |
| Lactose                | > 90             |
| Cendres                | 1,5              |
| Eau                    | complément à 100 |

On dissout la poudre précédente dans l'eau déminéralisée, de sorte que la solution ait une teneur en matières sèches de 19,35 %. On décationne cette solution par passage sur  
30

une colonne de résine cationique forte IR 120<sup>(R)</sup> (Rohm & Haas), ce qui conduit à une solution contenant 18,73 % de matières sèches dont le pH est 2,77.

5 On agite 565 g de cette solution et 56,5 g de résine anionique faible de matrice hydrophobe à base de polystyrène (IMAC HP 661<sup>(R)</sup>, Rohm & Haas, régénérée sous forme OH<sup>-</sup>) pendant 3 h à 10° C jusqu'à stabilisation du pH à la valeur finale 4,53. On sépare ensuite le perméat ainsi traité des billes de résine par filtration et on le sèche par lyophilisation.

10 Le perméat de protéines de lactosérum ainsi traité contient 1,75 % de protéines. L'analyse de son aminogramme montre un profil se caractérisant par une diminution de 20 % de la thréonine et par une augmentation de 50 % du tryptophane.

15 Pour recueillir le GMP, on lave la résine avec 1 l d'eau déionisée, puis on élue le GMP avec 50 ml de solution aqueuse à 0,6 % de NaOH, puis on rince avec 20 ml d'eau déionisée. Après avoir joint les volumes d'éluat et de rinçage, on concentre l'ensemble par ultrafiltration avec une membrane de coupure nominale de 3.000 dalton, puis l'on sèche le rétentat par lyophilisation et l'on obtient 870 mg de GMP.

## 20 Exemple 5

On percole 3,5 l de lactosérum doux préconcentré à 20 % de matière sèche, décationé sur colonne de résine cationique forte et de pH 1,09 à travers une colonne contenant 450 ml de résine anionique faible de matrice hydrophobe à base de polystyrène (IMAC HP 661<sup>(R)</sup>, Rohm & Haas), à raison de 2 volumes de lit/h.

25 On recueille l'équivalent de 4 volumes de lit, constituant 4 fractions égales de pH allant de 6 à 3 et dont la quantité de GMP enlevé va de 50 à 9 % (évalué par HPLC). Après réunion des 4 fractions, on obtient une solution de pH 4,5 dans laquelle 25 % du GPM a été enlevé (par rapport à la matière lactosérique de départ).

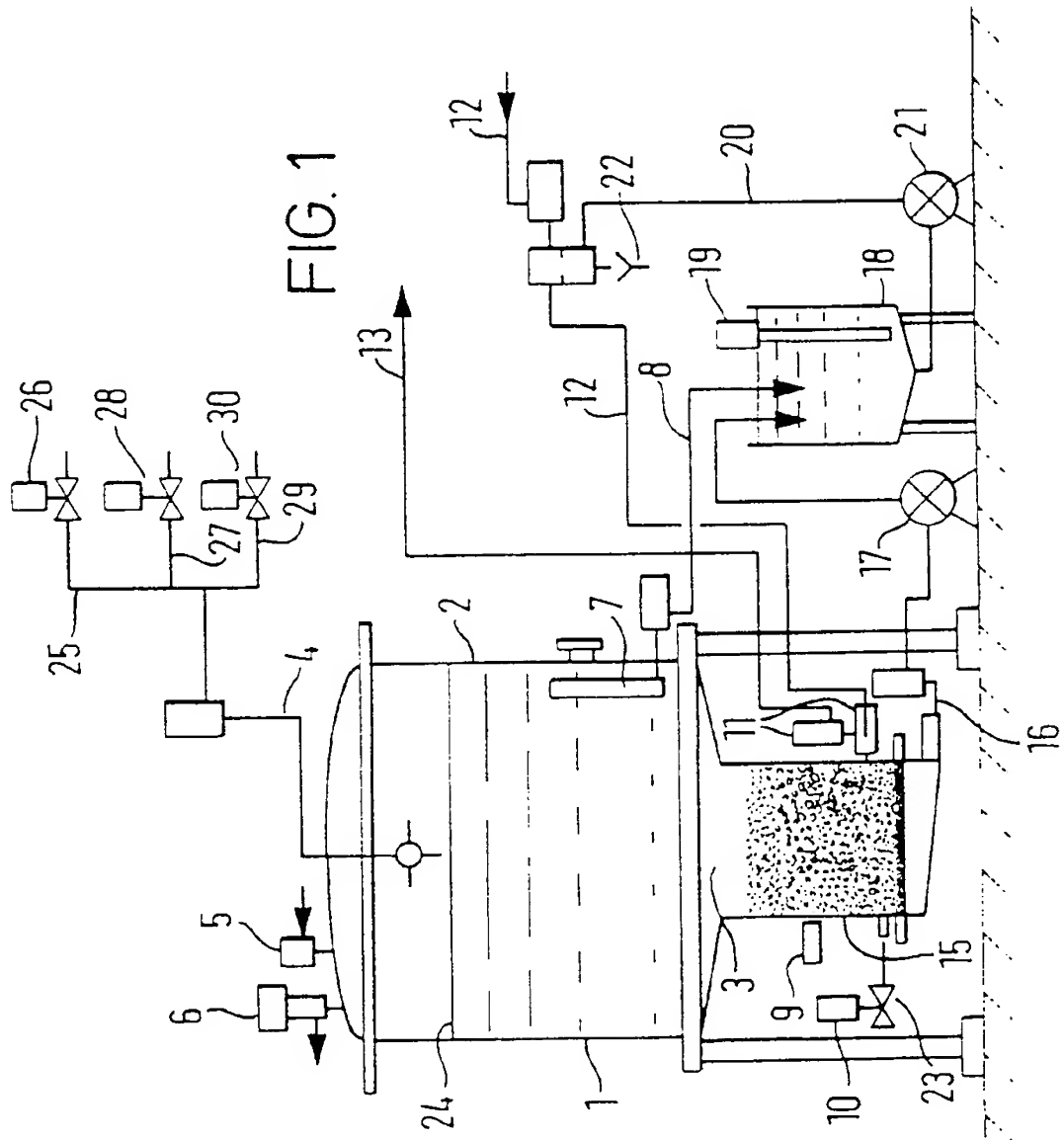
30 Pour recueillir le GMP, on procède comme à l'exemple 1 et on obtient des résultats équivalents quant à la pureté du GMP.

35

## Revendications

1. Procédé de traitement par échange d'ions d'une matière première liquide lactique contenant du GMP, dans le but de recueillir d'une part un produit utilisable comme source de protéine et d'autre part le GMP sous forme purifiée, caractérisé par le fait qu'il comprend les étapes suivantes:
  - i) Décationisation de la matière première liquide, de sorte que le pH ait une valeur de 1 à 4,5,
  - ii) Mise en contact du dit liquide avec une résine anionique faible de matrice hydrophobe, de manière prédominante sous forme alcaline jusqu'à un pH stabilisé,
  - iii) Séparation de la résine et du produit protéique liquide que l'on recueille et
  - iv) Désorption du GMP de la résine.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la matière première est un lactosérum doux de fromagerie préconcentré, de préférence à 10-23 % en poids et décationé ou complètement déionisé.
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la matière première est un concentrat de protéines de lactosérum doux délactosé et décationé.
4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la matière première est le produit de l'hydrolyse par une protéase d'une caséine native obtenue par précipitation acide du lait écrémé par un acide minéral ou par acidification biologique, le cas échéant avec addition d'ions calcium. le produit de l'hydrolyse par une protéase d'une caséine micellaire, obtenue par exemple par microfiltration d'un lait écrémé ou encore le produit de l'hydrolyse d'un caséinate par une protéase.
5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la matière première est un perméat d'ultrafiltration de lactosérum doux.
6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'on met la matière première liquide en présence de résine anionique faible de manière prédominante sous forme alcaline dans un réacteur sous agitation modérée à une température  $< 50^{\circ} \text{C}$ , de préférence comprise entre 0 et  $15^{\circ} \text{C}$ , pendant une à plusieurs heures, ce qui produit une augmentation progressive du pH du liquide traité, jusqu'à stabilisation, puis que l'on sépare le liquide de la résine par filtration ou centrifugation.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé par le fait que l'on utilise toute résine échangeuse d'anions faiblement basique sous forme de gel, macroporeuse ou macroréticulée, dont la matrice est hydrophobe.
- 5 8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé par le fait que l'on concentre le liquide ainsi traité, notamment par évaporation, puis qu'on le sèche, notamment par pulvérisation dans une tour de séchage.
- 10 9. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que, pour en séparer le GMP sous forme purifiée, on traite d'abord la résine par lavage, puis on désorbe le GMP avec une solution aqueuse acide, basique ou saline, notamment de NaOH, KOH ou  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , de concentration  $< 8\%$ , on la rince à l'eau déminéralisée, on joint ensuite l'éluat et les eaux de rinçage, puis on les déminéralise, notamment par ultrafiltration ou nanofiltration sur membrane de zone de coupure moyenne environ 3000 dalton et que
- 15 l'on sèche le rétentat, notamment par lyophilisation.
10. Utilisation du produit obtenu par le procédé selon l'une des revendications 1 à 8 comme matière première protéique dans la préparation des produits infantiles et diététiques conduisant à un profil en acides aminés caractérisé par un appauvrissement
- 20 en thréonine et un enrichissement en acides aminés aromatiques, notamment en tryptophane.
11. Utilisation du GMP purifié obtenu par le procédé selon la revendication 9 dans des compositions pharmaceutiques comme agent anti-thrombotique, anti-diarrhéique ou
- 25 anti-bactérien ou encore dans des aliments, notamment des produits de confiserie pour ses propriétés anti-plaque et anti-carie, pour ses propriétés fonctionnelles d'agent émulsifiant, gélifiant ou moussant ou pour ses propriétés diététiques, notamment dans des compositions infantiles.
- 30 12. Utilisation du GMP purifié obtenu par le procédé selon la revendication 9 comme agent anti-plaque et anti-carie dans des compositions d'hygiène dentaire.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 98/03176

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A23J1/20 A23C9/146 C07K14/47 A61K7/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A23J A23C C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
|----------|--|-----------------------|

|   |  |         |
|---|--|---------|
| X | US 5 280 107 A (YOSHIHIRO KAWASAKI)<br>13 January 1994   | 11,12   |
| A | see column 6, line 12 - line 15; claims<br>1-4; examples 1-3<br>see column 1, line 37 - line 50  | 1,8     |
| A | DATABASE WPI<br>Section Ch. Week 9529<br>Derwent Publications Ltd., London, GB;<br>Class A97, AN 95-220083<br>XP002044766<br>& JP 07 132049 A (SHOKUHIN SANGYO HIGH<br>SEPARATION SYSTEM), 23 May 1995<br>cited in the application<br>see abstract | 1-3,7-9 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 October 1998

Date of making of the international search report

27/10/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentplan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 551 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Desmets, G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/EP 93/03176

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No |
|----------|--|----------------------|
| A        | PATENT ABSTRACTS OF JAPAN<br>vol. 018, no. 032 (C-1154),<br>18 January 1994<br>& JP 05 262793 A (SNOW BRAND MILK PROD CO<br>LTD), 12 October 1993<br>see abstract<br>---   | 1,2,5                |
| X        | EP 0 291 264 A (SOCIETE DES PRODUITS<br>NESTLE) 17 November 1988<br>see page 3, line 30 - line 40; claims 1-11<br>---  | 11,12                |
| X        | EP 0 397 571 A (CENTRE NATIONAL DE LA<br>RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 14 November 1990<br>see page 1; claims 1,2<br>---   | 11                   |
| X        | OUTINEN M ET AL: "CHROMATOGRAPHIC<br>ISOLATION OF $\alpha$ -CASEIN MACROPEPTIDE FROM<br>CHEESE WHEY WITH A STRONG BASIC ANION<br>EXCHANGE RESIN"<br>MILCHWISSENSCHAFT.<br>vol. 50, no. 10, 1 January 1995, pages<br>570-574, XP000539295<br>see page 570 - page 571<br>--- | 11                   |
| X        | S. MARCHALL "Casein macropeptide from<br>whey- A new product opportunity"<br>FOOD RESEARCH QUARTERLY,<br>vol. 51, no. 1, 1991, pages 86-91,<br>XP002044765<br>---  | 11                   |
| A        | see page 86 - page 91<br>---   | 1                    |
| X        | DE 43 44 342 A (MILUPA) 29 June 1995<br>see column 1, line 46 - line 52; claims<br>1-8<br>---  | 10                   |
| X        | G. SMITHERS: "New casein products for the<br>food industry"<br>FOOD AUSTRALIA,<br>vol. 43, no. 6, 1991, pages 252-254,<br>XP002080868<br>---   | 11                   |
| A        | see page 254<br>---  | 1                    |
| A        | GB 2 188 526 A (AGRICULTURAL AND FOOD<br>RESEARCH COUNCIL) 7 October 1987<br>cited in the application<br>see page 1, line 21 - line 28; claims 1-26<br>-----   | 1,11                 |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/03176

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 5280107 A                              | 18-01-1994          | JP 4330100 A               | 18-11-1992          |
|   |                     | FR 2671801 A               | 24-07-1992          |
|   |                     | GB 2251858 A.8             | 22-07-1992          |
| EP 291264 A                               | 17-11-1988          | JP 2622686 B               | 18-06-1997          |
|   |                     | JP 63284199 A              | 21-11-1988          |
|   |                     | US 5061622 A               | 29-10-1991          |
| EP 397571 A                               | 14-11-1990          | FR 2646775 A               | 16-11-1990          |
|   |                     | JP 3101625 A               | 26-04-1991          |
|   |                     | US 5063203 A               | 05-11-1991          |
| DE 4344342 A                              | 29-06-1995          | WO 9517102 A               | 29-06-1995          |
|   |                     | EP 0741522 A               | 13-11-1996          |
|   |                     | JP 9507123 T               | 22-07-1997          |
| GB 2188526 A                              | 07-10-1987          | NONE                       |                     |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/EP 98/03176

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 A23J1/20 A23C9/146 C07K14/47 A61K7/16

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A23J A23C C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où des documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie 1 Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents

no. des revendications visées

|   |  |         |
|---|--|---------|
| X | US 5 280 107 A (YOSHIHIRO KAWASAKI)<br>18 janvier 1994   | 11.12   |
| A | voir colonne 6, ligne 12 - ligne 15;<br>revendications 1-4; exemples 1-3<br>voir colonne 1, ligne 37 - ligne 50  | 1.8     |
| A | DATABASE WPI<br>Section Ch. Week 9529<br>Derwent Publications Ltd., London, GB;<br>Class A97, AN 95-220083<br>XP002044766<br>& JP 07 132049 A (SHOKUHI SANGYO HIGH<br>SEPARATION SYSTEM), 23 mai 1995<br>cité dans la demande<br>voir abrégé | 1-3.7-9 |

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle est indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 octobre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27/10/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3018

Fonctionnaire autorisé

Desmedt, G

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demi Internationale No

PCT/EP 98/03176

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées |
|-----------|---|-------------------------------|
| A         | PATENT ABSTRACTS OF JAPAN<br>vol. 018, no. 032 (C-1154),<br>18 janvier 1994<br>& JP 05 262793 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD), 12 octobre 1993<br>voir abrégé<br>---  | 1,2,5                         |
| X         | EP 0 291 264 A (SOCIETE DES PRODUITS NESTLE) 17 novembre 1988<br>voir page 3, ligne 30 - ligne 40;<br>revendications 1-11<br>---  | 11,12                         |
| X         | EP 0 397 571 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 14 novembre 1990<br>voir page 1; revendications 1,2<br>---  | 11                            |
| X         | OUTINEN M ET AL: "CHROMATOGRAPHIC ISOLATION OF $\alpha$ -CASEIN MACROPEPTIDE FROM CHEESE WHEY WITH A STRONG BASIC ANION EXCHANGE RESIN"<br>MILCHWISSENSCHAFT,<br>vol. 50, no. 10, 1 janvier 1995, pages 570-574, XP000539295<br>voir page 570 - page 571<br>--- | 11                            |
| X         | S. MARCHALL: "Casein macropeptide from whey- A new product opportunity"<br>FOOD RESEARCH QUARTERLY,<br>vol. 51, no. 1, 1991, pages 86-91,<br>XP002044765<br>---   | 11                            |
| A         | voir page 86 - page 91<br>---   | 1                             |
| X         | DE 43 44 342 A (MILUPA) 29 juin 1995<br>voir colonne 1, ligne 46 - ligne 52;<br>revendications 1-8<br>---   | 10                            |
| X         | G. SMITHERS: "New casein products for the food industry"<br>FOOD AUSTRALIA,<br>vol. 43, no. 6, 1991, pages 252-254,<br>XP002080868<br>voir page 254<br>---  | 11                            |
| A         |   | 1                             |
| A         | GB 2 188 526 A (AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL) 7 octobre 1987<br>cité dans la demande<br>voir page 1, ligne 21 - ligne 28;<br>revendications 1-26<br>-----   | 1,11                          |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demi Internationale No

PCT/EP 93/03176

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| US 5280107 A                                    | 18-01-1994             | JP 4330100 A                            | 18-11-1992             |
|   |                        | FR 2671801 A                            | 24-07-1992             |
|   |                        | GB 2251858 A.B                          | 22-07-1992             |
| EP 291264 A                                     | 17-11-1988             | JP 2622686 B                            | 18-06-1997             |
|   |                        | JP 63284199 A                           | 21-11-1988             |
|   |                        | US 5061622 A                            | 29-10-1991             |
| EP 397571 A                                     | 14-11-1990             | FR 2646775 A                            | 16-11-1990             |
|   |                        | JP 3101625 A                            | 26-04-1991             |
|   |                        | US 5063203 A                            | 05-11-1991             |
| DE 4344342 A                                    | 29-06-1995             | WO 9517102 A                            | 29-06-1995             |
|   |                        | EP 0741522 A                            | 13-11-1996             |
|   |                        | JP 9507123 T                            | 22-07-1997             |
| GB 2188526 A                                    | 07-10-1987             | AUCUN                                   |                        |